

primeFISH® *Her2/Neu* (17q12) LS DC Prob Kiti

Ürün Kodu	: 17-012
Spektrum	: Kırmızı / Yeşil
Raf Ömrü	: 28.02.2020
Lot	: 180219-12
Saklama Şartı	: -20 °C
Kullanıma Hazır	: 10 test
İçerik	: 100 µl Probe ve 100 µl DAPI

DNA Probu

Kullanıma hazır *HER2/Neu* (*ERBB2*)/kromozom 17 sentromer spesifik DNA FISH Probu, formaline fikse ve parafin içine gömülmüş (FFPE) dokularda, taze solid dokularda, kültüre edilmiş dokularda ve touch materyali dokularda kullanılır. *HER2/Neu* (*ERBB2*) probu kromozom 17q12 bölgesine lokalize ve *HER2/Neu* (*ERBB2*) geninin kopya sayısını saptamak üzere tasarlanmıştır. *HER2/Neu* (*ERBB2*) gen DNA probu, *ERBB2* genini de içine alan ve bu genin sentromer tarafında RH41770 ve telomer tarafında ise SHGC-156300 STS markırlarını içermekte ve kırmızı floresan molekülü ile işaretlenmiştir. Kitin kontrol probu ise kromozom 17 sentromer bölgesine (17p11.1-q11) spesifik bir DNA probudur ve yeşil floresan molekülü ile işaretlenmiştir.

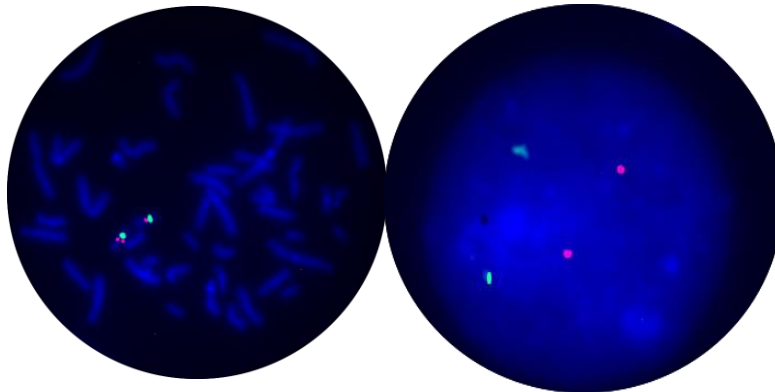
Sinyallerin incelenmesi ve yorumlanması

Uygun filtreli epifloresan mikroskopta preparat incelendiğinde, hem normal diploid interfaz çekirdeklerinde hem de metafaz kromozomlarında, iki normal *Her2/Neu* (*ERBB2*) genine karşılık iki kırmızı sinyal ve iki normal sentromer 17'ye karşılık gelen iki yeşil sinyal görülür (**Şekil**). Hücrelerde genin amplifikasyonu ve kromozomların kopya sayısındaki artışa bağlı olarak *ERBB2* (kırmızı) sinyallerin sayısı, kontrol sentromer 17 (yeşil) sinyallerinin sayısına göre artar. Buna bağlı olarak sayısal anomali ve *Her2* genin kopya sayısındaki artışları, amplifikasyondan ayırmak için *Her2* genin kopya sayısı ile kromozom 17'nin kopya sayısı oranlanır. Bu çerçevede, oransal olarak, 2.2 veya daha fazla bir *Her2*(Neo)/Cen17 oranı amplifikasyon olarak tanımlanır; 1.8 ile 2.2 aralığındaki oranlar sınırdaki kabul edilir (**Tablo**). Bu nedenle, her bir laboratuvarın, kendi cut-off sınırını belirlemesi gerekir. Ayrıca parafin bloklardan ve solid dokulardan elde edilen preparatlar sinyal kalitesini etkileyebileceği gibi, cross hibridizasyonlar ve artefakt sinyal oluşumu ile false pozitif sonuca götürebilir. Bu durumda, mutlaka opsiyonel preparat hazırlama metodları kullanılarak informatik FISH sinyali alınmasına gidilmelidir.

Preparatta doku ve hücre artıkları istenmeyen spesifik olmayan ve artefakt sinyallere neden olabilir. Bu durumda, alternatif preparat hazırlama metodları kullanılarak informatik FISH sinyali alınmasına gidilmelidir.

Tablo.

	Normal	Amplifikasyon durumunda
Beklenen sinyaller	2K2Y	K/Y=2.2 ve daha yüksek



Şekil. Metafaz ve interfaz nükleusunda iki adet *Her2/Neu* (*ERBB2*) sinyali (kırmızı) ve iki adet kromozom 17 sentromer sinyali (yeşil).

Kit içeriği

DNA FISH probu, 5 test için 50 µl veya 10 test için 100 µl halinde hazırlanmıştır. Problar, hibridizasyon tamponu ile karıştırılmış ve kullanıma hazırdır. Her bir preparat için 10 µl prob karışımı ve 10 µl DAPI kullanılmalıdır. Kit içeriği aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tüp	5 test	10 test	Renk
Prob karışımı	50 µl	100 µl	Kırmızı kapak
DAPI Counterstain	50 µl	100 µl	Mavi kapak

Kitin ve preparatların saklama koşulları

Kit -20 °C' de saklanmalı ve direk ışıktan uzak tutulmalıdır. Aynı zamanda hibridizasyon yapılan preparat örnekleri de uzun süre saklanacaksa -20 °C de, kısa süreliğine ise 4 °C de tutulmalıdır. Hem prob, hem de hibridizasyon yapılmış preparatlar tekrar tekrar dondurulup çözülmemelidir.

Gerekli solüsyonlar (Kit içeriğinde bulunmaz)

- 20xSSC
- 2xSSC
- Etanol
- 1xPBS
- %0,4 Pepsin
- 1% Formaldehit
- 4xSSC-Tween20 (%0.5)
- İmmersiyon yağı

Gerekli cihazlar ve malzemeler (Kit içeriğinde bulunmaz)

Şale (En az 4 adet)	Su banyosu (2 adet) veya hot plate veya hibridizasyon fırını
Lam / Lamel (22x22mm)	Termometre
Pens	Mikropipet seti (10, 100, 200, 1000 µl)
Epifloresan mikroskop (uygun floresan filtreler)	Mikropipet uçları (10, 100, 200, 1000 µl)
Çeker ocak	Hibridizasyon kabı
Mikrosantrifüj	Mikrosantrifüj tüpleri
pH metre	

Uyarılar ve önlemler

- Kit, FISH çalışma eğitimi almış kişiler tarafından kullanılmalıdır.
- Kit sadece uygun laboratuvar ekipmanı ile kullanılmalıdır.
- Preparatlar ve preparatlarda fikse edilen hücre ve dokular, FISH çalışma kalite standartlarına uygun olmalıdır.
- Uygun olmayan saklama koşulları ve kullanma şartları, prob kalitesini hızlıca düşürür ve deneyde başarısızlığa neden olur.
- Çalışmalar, kitin protokolüne göre yapılmalıdır.
- Çalışma sırasında laboratuvar önlüğü ve eldiven kullanılmalıdır.
- Kitin içeriği direk deri temasından sakınılmalıdır.
- Kit atıkları laboratuvar kurallarına uygun atılmalıdır.
- Çalışılan örnekler potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak düşünülmeli ve laboratuvar risk faktörleri için gerekli önlemler alınmalıdır.
- Raf ömrü geçen ürünler kullanılmaz.
- Tekrarlayan dondurma ve çözündürme işleminden, ayrıca uygun olmayan saklama koşullarından kaçınılmalıdır.

FISH protokolü

FISH çalışması temel olarak örneklerden preparat hazırlama, hazır kitin kullanılması ve elde edilen sonuçların yorumlanması basamaklarından oluşur.

Başarılı bir FISH analizi için probun kalitesi kadar incelenecek materyalin kalitesi ve bunun preparat şeklinde hazırlanmasına bağlıdır. Bu nedenle, FISH çalışmaları için farklı örneklerden farklı optimize preparat hazırlama protokolleri kullanılmalıdır.

Preparat hazırlanması

Taze olarak sitogenetik amaçlı hazırlanmış preparatlar kullanılır. Preparatlar sitogenetik amaçlara uygun hazırlandıktan sonra oda ısısında 1-2 saat veya 40-50 °C de 30 dakika tutulur. Daha sonra ışık mikroskobu altında, hücre sıklığı ve dağılımı dikkate alınarak lam üzerindeki hibridizasyon yapılacak bölge ya elmas yada cama yazar kalemle işaretlenir. Preparatın doku ve sitoplazma artıklarından arındırılması dikkate edilmelidir.

Kullanılacak preparatta hücre nükleusları kirli, stoplazmik ve doku artıkları varsa veya histolojik doku kesitleri kullanılıyorsa, aşağıdaki opsiyonel olarak verilen preparat hazırlama yöntemi kullanılabilir. Preparatlar parafin bloklardan hazırlanırsa lamlardan parafin uzaklaştırma metodu kullanılmalıdır.

Opsiyonel pepsin uygulaması

Preparatlarda sitoplazmik veya doku kalıntıları varsa veya kullanılan preparat histolojik bir preparat ise aşağıdaki protokol uygulanmalıdır:

- 25-30 ml 0,01 N HCl çözeltisi 37 °C' de ısıtılır.
- %0.4 hazırlanan (distile suda) pepsinden 12 µl alınır ve 25-30 ml 0,01 N HCl çözeltisi ile birleştirilir. Bu karışımda preparatlar 37 °C' de 10 dakika tutulur.

Not: Preparattaki doku ve sitoplazmik kalıntılar fazla ise bu süre uzatılabilir.

- Preparatlar sürenin sonunda oda ısısında 2xSSC' de veya 1xPBS' de 3 dk 3 kez yıkanır.
- Preparatlar, %1 lik formaldehitte, oda ısısında 5 dk tutulur.
- Tekrar 2xSSC veya 1xPBS'de 5 dk 3 kez yıkanır.
- Preparatlar %70, 80 ve 100 alkol serilerinde 3 dk tutulur.
- Preparatlar, havada 5-10 dk kurutulur ve FISH uygulamasına geçilir.

FISH probunun uygulanması, denatürasyonu ve hibridizasyonu

Aşağıdaki basamaklarda, hem FISH probu hem de hibridizasyona alınan preparatlar direk ışıkla temastan sakınılmalıdır.

1. DNA FISH probu, -20 °C' den alınarak kısaca vortekslenir ve mikrosantrifüjde kısaca santrifüj edilir.
2. Mikropipet ile 10 µl alınır ve 24x24 veya 22x22 mm' lik lamel üzerine konur.
3. Önceden hazırlanmış ve hibridizasyon bölgesi belirlenmiş preparata, üzerinde 10 µl prob olan lamel yerleştirilir.

Not: Bu aşamada hava kabarcığı kalmamasına ve lamın yönüne dikkat edilmelidir.

4. Lamlar metal bir tepsi üzerine yerleştirilerek önceden 65-70 °C' ye getirilmiş su banyosunda 6-8 dakika tutulur. Burada prob ve hedef DNA dizileri beraber denatüre edilir.

Not: Denatürasyon, hotplate, fırın vb nemsiz bir ortamda gerçekleştirildiğinde lamellerin etrafı solüsyonla kapatılarak prob karışımının buharlaşması önlenir.

5. Preparatlar, denatürasyon sonrasında önceden 37-42 °C' ye hazırlanmış su banyosunda veya nemli bir kap içinde 12-16 saat hibridizasyona bırakılır.

Yıkama ve zıt boyama

Hibridizasyon süresi tamamlandıktan sonra, preparatlara aşağıdaki yıkama ve boyama basamakları uygulanır ve ışıktan korunur.

Not: Hibridizasyon hangi ısıda yapıldı ise yıkama işlemleri de aynı ısıda gerçekleştirilmelidir.

1. Preparatlar, önceden 37-42 °C' ye ısıtılmış 2xSSC'de 5 dakika yıkanır. Lameller düşmemiş ise, lam üzerindeki doku ve hücrelere zarar vermeden ince uçlu bir pens ile uzaklaştırılır.
2. Birinci yıkama bir kez daha tekrarlanır.
3. Preparatlar, 37-42 °C' deki 2 ayrı 4xSSC-Tween20 içeren solüsyonda ayrı ayrı yıkanır.

Not: Gerekirse bu yıkama 3 kez tekrarlanabilir.

4. Preparatlar, oda ısındaki 4xSSC' den geçirildikten sonra, preparat üzerindeki sıvının uzaklaştırılması için 1-2 dakika dik pozisyonda tutulur.
5. Her bir hibridizasyon alanı için 22x22 veya 24x24 mm temiz, şeffaf lameller düz bir zemine konur ve üzerine 10 µl zıt boyama solüsyonu ilave edilir. Lamaların hibridizasyona sokulan işaretli bölgesi, lamel üzerindeki zıt boyama solüsyonu üzerine yerleştirilir.

Preparatlar ışıktan korunarak ya bir kağıt veya alüminyum folyo ile sarılır veya ışık geçirmeyen bir kutu içine alınır. Preparatlar hemen incelenmeyecekse -20 °C' de, hemen incelenecekse kısa süreliğine 4 °C' de tutulabilir.

Mikroskopta inceleme

Preparat üzerinden fazla olan zıt boyama solüsyonu bir kağıt yardımı ile uzaklaştırıldıktan sonra, epifloresan mikroskopta 10x büyütmeli objektifte ve DAPI filtrede tüm preparat incelenir. Sonrasında ise işaretli probun dalga boyuna göre yeşil, kırmızı ve çift renk (yeşil-kırmızı) filtreler ve 100x objektifte preparat analiz edilir.

Floresan mikroskop objektifleri ve floresan filtreler, kullanılan problemlerin floresan boyalarına uygun olmalıdır. Mevcut kitte kullanılan boyaların dalga boyları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Floresan boyalarının dalga boyları.

Floresan Boya	Excitation (max)	Emission (max)
Kırmızı (Red)	573	602
Portakal (Orange)	544	572
Altın (Gold)	532	552
Yeşil (Green)	492	518
Turkuaz (Aqua)	432	472
DAPI	360	460